

金ナノ粒子を用いた高分解能X線CTイメージングによる後肢動脈虚血モデルマウスのarteriogenesisメカニズムの解明

著者	河村 圭一郎
号	84
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3312号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61230

氏 名	かわむら けいいちろう 河村 圭一郎
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 26 年 9 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT イメージングによる後肢動脈虚血モデルマウスの arteriogenesis メカニズムの解明
論文審査委員	主査 教授 大内 憲明 教授 権田 幸祐 教授 館 正弘 教授 齋藤 春夫

論 文 内 容 要 旨

背景：動脈硬化関連疾患における虚血に陥った組織に対する生体反応には、**angiogenesis** と **arteriogenesis** という 2 つの重要な機構がある。**angiogenesis** は既存血管からの新生血管の発芽と定義され、虚血による低酸素刺激により引き起こされる。一方、**arteriogenesis** は既存側副血管の拡張とリモデリングと定義され、血流増加による側副血行路の血管壁への圧力増加とシェアストレスにより引き起こされる。近年、これらのメカニズムが動脈硬化関連疾患の治療にも応用され始めており、メカニズムの更なる解明が動脈硬化関連疾患に対する新たな治療法の発展につながると考えられる。過去の研究において、動脈硬化関連疾患に対する治療の効果判定は主に、レーザードップラーイメージング、組織血管密度、血管造影で行われてきた。しかし、これらの方法では分解能や測定範囲に限界があり、直径 1mm 以下の微小血管を *in vivo* で可視化し、高精度解析することは困難であった。最近では、動物実験用の X 線 Computed Tomography(CT) 装置の改良に伴い、虚血モデル動物の側副血管を数百 μm レベルで形態的に描出することが可能となってきた。しかし、虚血モデルマウスで側副血管の微小な拡張・収縮プロセスや微細な形態変化をイメージングするには、少なくとも 100 μm 以下の分解能が必須である。よって、これまでのイメージング法ではまだ不十分であり、虚血組織の **angiogenesis** や **arteriogenesis** のメカニズムを詳細に解析するには至っていなかった。

目的：本研究では、金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT イメージングを用い、後肢動脈虚血モデルマウスの **arteriogenesis** メカニズムを明らかにすることを目的とする。

材料・方法：本実験ではまず、後肢動脈虚血モデルマウスを作成し、レーザードップラーイメージングで評価した。次に、金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT を用いた 3D 血管イメージングを行い、**arteriogenesis** に起因する深大腿動脈の拡張・収縮やコークスクリュウ様血管の成熟に対して形態学的解析を詳細に行った。次に、コークスクリュウ様血管周囲の組織の分子レベルでの解析のため、筆者らが独自に考案した組織マーキング法を使って、コークスクリュウ様血管が発現している部位とその他の部位に分けて筋組織を採取し、血管新生に関わる蛋白質の発現レベルをウェスタンブロッティングにて解析した。

結果：手術前と手術後、また、手術 2 週間後、4 週間後、6 週間後、8 週間後に測定した Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) での正常肢の血流を基準とした虚血肢の相対的血流量は、手術直後には 0.24 ± 0.08 (±標準偏差、 $n=5$) と有意に減少した ($P<0.01$)。その後、2 週間後までで 0.38 ± 0.18 (±標準偏差、 $n=5$) まで回復し、以後は平衡状態となった。

手術直後、手術 4 日後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後に行った高分解能 X 線 CT による 3D イメージングでは、手術直後、4 日後の虚血肢の手術部位に血流途絶を認めた。また、

虚血肢の1週間後以降で拡張した深大腿動脈が可視化され、そこから末梢へ伸びるコークスクリュー様血管を認めた。虚血肢の深大腿動脈直径は正常肢に対し、根部において1週間後で約2倍となり、2週間後にかけて約1.2倍まで有意に縮小していた ($P<0.05$)。また、中部、コークスクリュー様血管分岐部では1週間後で約1.8倍となり、2週間後にかけて約1.1倍まで有意に縮小していた ($P<0.05$)。

コークスクリュー様血管についての解析では、コークスクリュー様血管の1ユニット長 (1らせん分の開始点から終了点までの直線距離)、1ユニット直径 (血管を直線とみなした時のらせんの振れ幅) は観察時期でほとんど差を認めなかった。一方、コークスクリュー様血管のユニット総数は1週間後で 11.4 ± 2.4 個 (±標準偏差、 $n=5$) に比べ、4週間後で 14.8 ± 1.3 個 (±標準偏差、 $n=5$) と有意に増加しており ($P<0.05$)、コークスクリュー様血管の全長においても1週間後で $6.6 \pm 1.1\text{mm}$ (±標準偏差、 $n=5$) に比べ、4週間後で $8.6 \pm 0.8\text{mm}$ (±標準偏差、 $n=5$) と有意に増加していた ($P<0.05$)。

コークスクリュー様血管を含む筋肉組織のウェスタンブロッティングによる解析では、血管新生関連蛋白 (CD31、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) の β -actin に対する発現量は、正常肢と虚血肢で差がない傾向であり、経時的にも変化がない傾向であった。

考察: 金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT による後肢動脈虚血モデルマウスの血管イメージングにより、虚血肢において、深大腿動脈が虚血手術1週間後に2倍に拡張し、2週間後には通常の大きさへ縮小することが明らかとなり、この拡張に引き続き、深大腿動脈から分岐するコークスクリュー様血管が成熟した。コークスクリュー様血管を高精度に解析すると、虚血肢において、1ユニット直径、1ユニット長は観察時期でほとんど差を認めない一方、ユニット総数と全ユニット長が経時的に増加するという結果になった。また、正常肢においては、深大腿動脈から側副血管の分岐が、虚血肢のコークスクリュー様血管の出現部位と同等部位に認められた。虚血組織において新規の血管構築には2週間程度を要するという先行研究の結果を併せて考えると、以上の結果は、高分解能 X 線 CT の解像度では見えない程微細な側副血管が arteriogenesis により成熟し、コークスクリュー様血管として経時的に可視化されてきたことを示唆している可能性がある。本研究で認められたコークスクリュー様血管はヒトの末梢動脈疾患患者にも認められる。これらの血管の発現メカニズムや発現場所、発現時期などはまだ詳細に解明されていないが、末梢動脈疾患患者における虚血組織の血流維持に重要な役割を果たしていると考えられる。よって、本研究で得られた知見はヒトの arteriogenesis のメカニズムを知ることと、末梢動脈疾患患者に対する新たな治療法開発の一助となりうると考えられた。

結論: 本研究では、後肢動脈虚血モデルマウスを用いて、arteriogenesis のメカニズムを高分解能 X 線 CT による 3D イメージングにより高精度に解析することを試みた。その結果、深大腿動脈の拡張と収縮、それに伴うコークスクリュー様血管の成熟が、後肢虚血環境における arteriogenesis 由来の血管リモデリングメカニズムとして極めて重要であることが分かった。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT イメージングによる後肢動脈虚血モデルマウスの arteriogenesis メカニズムの解明

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 先進外科学 分野

氏名 河村 圭一郎

動脈硬化関連疾患における虚血に陥った組織に対する生体反応には、angiogenesis と arteriogenesis という 2 つの重要な機構がある。近年、これらのメカニズムが動脈硬化関連疾患の治療にも応用され始めており、メカニズムの更なる解明が動脈硬化関連疾患に対する新たな治療法の発展につながると考えられる。しかし、これまでのイメージング法では分解能や測定範囲に限界があり、虚血組織の angiogenesis や arteriogenesis のメカニズムを詳細に解析するには至っていなかった。

そこで本研究では、金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT イメージングを用い、後肢動脈虚血モデルマウスの arteriogenesis メカニズムを明らかにすることを目的とした。

金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線 CT による後肢動脈虚血モデルマウスの血管イメージングにより、虚血肢において、深大腿動脈が虚血手術 1 週間後に 2 倍に拡張し、2 週間後には通常の大きさへ縮小することが明らかとなり、この拡張に引き続き、深大腿動脈から分岐するコークスクリュー様血管が成熟した。コークスクリュー様血管を高精度に解析すると、虚血肢において、1 ユニット直径、1 ユニット長は観察時期でほとんど差を認めない一方、ユニット総数と全ユニット長が経時的に増加するという結果になった。また、正常肢においては、深大腿動脈から側副血管の分岐が、虚血肢のコークスクリュー様血管の出現部位と同等部位に認められた。虚血組織において新規の血管構築には 2 週間程度を要するという先行研究の結果を併せて考えると、高分解能 X 線 CT の解像度では見えない程微細な側副血管が arteriogenesis により成熟し、コークスクリュー様血管として経時的に可視化されてきたことを示唆している可能性がある。

以上の結果と、本研究で認められたコークスクリュー様血管がヒトの末梢動脈疾患患者にも認められることより、深大腿動脈の拡張と収縮、それに伴うコークスクリュー様血管の成熟が、後肢虚血環境における arteriogenesis 由来の血管リモデリングメカニズムとして極めて重要であることが分かった。

本研究はヒトの arteriogenesis のメカニズムを知ることと、末梢動脈疾患患者に対する新たな治療法を開発する上で有意義な知見をもたらした。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。